

## **Embriogenesis somatik langsung dan regenerasi planlet kopi arabika (*Coffea arabica*) dari berbagai eksplan**

*Direct somatic embryogenesis and regeneration of arabica coffee plantlets (Coffea arabica) from different explants*

Fetrina OKTAVIA<sup>1)</sup>, SISWANTO<sup>1)</sup>, Asmini BUDIANI<sup>1)</sup> & SUDARSONO<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor 16151, Indonesia

<sup>2)</sup> Program Studi Bioteknologi, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor

### **Summary**

*Tissue culture technique for arabica coffee faces some problems, mainly in plantlets regeneration from cultured explants. The objectives of this experiment were to examine the effect 2,4-D and 2-ip combinations on somatic embryogenesis and regeneration of arabica coffee from several different explants. Basal medium used in this experiment was MS medium with ½ concentration of macro and micro salts. Experiment to induce primary somatic embryos (SE) was arranged in factorial randomized complete design with 10 repeats. The first factor was the type of explants, leaf, epicotyl, hipocotyl and root explants. The second factor was plant growth regulator i.e. combination of 1 µM 2,4-D with 5, 10, 15, 20 µM and combination of 5 µM 2,4-D with 5, 10, 15 and 20 µM 2-ip. To multiply SE, secondary SE was induced from primary SE on medium containing combination of 0.6 µM IAA and 13.3; 17.8 and 22.2 µM BAP. Cotyledonary SE were germinated on media containing GA<sub>3</sub> (0, 5, 10 and 15 µM), and then regenerated on medium free of growth regulator. Plantlets with 4-5 leaf pairs were transferred into the soil medium for acclimatization. The results show that primary SE can be induced from all explants with the highest frequency on medium containing 1 µM 2,4-D and 15 µM 2-ip. Induction of primary SE, in leaf explant was more effective than other explants. Medium containing 0.6 µM IAA and 22.2 µM BAP gave*

*the highest percentage of SE multiplication i.e. 52.6% with average SE number of 6.25. Plantlets regeneration can be conducted by culturing SE on maturation medium free of growth regulator for one month followed by germinating on medium containing GA<sub>3</sub>, and then culturing on medium free of growth regulator again. The highest percentage of germinated embryos was obtained after three weeks and six weeks cultured in the medium containing 5µM GA<sub>3</sub>, i.e 49% and 90.15 respectively. From total plantlets obtained, 75% of them were normal. Sixty percents of the young plants grew well in the greenhouse.*

[Key words: *Coffea arabica*, somatic embryogenesis, *in vitro* culture]

### **Ringkasan**

Teknik kultur jaringan tanaman kopi arabika masih menghadapi beberapa kendala terutama pada tingkat regenerasi planlet dari eksplan yang dikulturkan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kombinasi 2,4-D dan 2-ip terhadap embriogenesis somatik dan regenerasi kopi arabika dari berbagai eksplan. Media dasar yang digunakan adalah medium MS ½ konsentrasi garam makro dan mikro. Percobaan induksi embrio somatik (ES) primer disusun menurut rancangan acak lengkap faktorial dengan 10 ulangan. Faktor pertama adalah jenis eksplan,

terdiri atas daun, epikotil, hipokotil dan akar *in vitro*. Faktor kedua adalah zat pengatur tumbuh, yaitu kombinasi 1  $\mu\text{M}$  2,4-D dengan 5, 10, 15 dan 20  $\mu\text{M}$  2-ip, serta kombinasi 5  $\mu\text{M}$  2,4-D dengan 5, 10, 15 dan 20  $\mu\text{M}$  2-ip. Untuk memperbanyak jumlah ES yang didapatkan, dilakukan induksi ES sekunder dari ES primer pada medium yang mengandung kombinasi 0,6  $\mu\text{M}$  IAA dan 13,3; 17,8 dan 22,2  $\mu\text{M}$  BAP. ES fase kotiledon kemudian dikecambahkan pada medium yang mengandung  $\text{GA}_3$  (0, 5, 10 dan 15  $\mu\text{M}$ ) dan selanjutnya diregenerasikan pada medium tanpa zat pengatur tumbuh. Planlet yang mempunyai 4-5 pasang daun dipindahkan ke medium tanah untuk aklimatisasi. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa ES primer dapat diinduksi pada semua eksplan yang digunakan dengan frekuensi tertinggi pada medium yang mengandung 1  $\mu\text{M}$  2,4-D dan 15  $\mu\text{M}$  2-ip. Induksi ES primer pada eksplan daun lebih efektif dibandingkan eksplan lainnya. Untuk memperbanyak ES, medium yang mengandung IAA 0,6  $\mu\text{M}$  dan BAP 22,2  $\mu\text{M}$  memberikan persentase tertinggi pembentukan ES sekunder yaitu 52,6% dengan rata-rata jumlah ES 6,25. Regenerasi planlet dapat dilakukan dengan mengkulturkan ES pada medium maturasi tanpa zat pengatur tumbuh selama satu bulan, kemudian dikecambahkan dalam medium yang mengandung  $\text{GA}_3$ , dan selanjutnya dipindah ke medium tanpa zat pengatur tumbuh kembali. Perkecambahan ES tertinggi diperoleh pada medium dengan penambahan  $\text{GA}_3$  5  $\mu\text{M}$  yaitu 40,9% setelah tiga minggu dan 90,1% setelah enam minggu. Dari total planlet diperoleh 75% planlet normal. Hasil aklimatisasi menunjukkan bahwa 60% bibit mampu bertahan di rumah kaca.

### Pendahuluan

Sampai saat ini perbanyak kopi arabika umumnya dilakukan secara generatif menggunakan biji atau secara vegetatif menggunakan setek, okulasi dan sambung pucuk. Cara perbanyak ini memiliki keterbatasan pada jumlah bahan tanam.

Dengan teknik kultur jaringan diharapkan kendala tersebut dapat diatasi, sehingga bahan tanam klonal berjumlah besar dapat disediakan dalam waktu yang relatif singkat. Selain itu, ketersediaan sistem regenerasi *in vitro* tanaman kopi arabika juga sangat diperlukan dalam program pemuliaan untuk mendapatkan bibit unggul dengan sifat-sifat tertentu yang diinginkan, seperti produksi tinggi sekaligus tahan hama atau penyakit melalui rekayasa genetik.

Usaha perbanyak kopi arabika melalui kultur jaringan telah lama dilakukan namun sampai saat ini masih menghadapi berbagai kendala. Carneiro & Ribeiro (1990) dan Priyono & Hartana (1991) berhasil meregenerasikan planlet melalui pembentukan tunas adventif. Pembentukan embrio somatik dari berbagai jenis eksplan juga telah dilaporkan (Priyono, 1991; Neuenschwander & Baumann, 1992; Priyono & Danimihardja, 1991; Priyono, 1993; Bieysee *et al.*, 1993; Sreenath *et al.*, 1995), namun tingkat keberhasilannya relatif rendah dan masih mengalami kesulitan dalam meregenerasikan menjadi planlet.

Di samping pemilihan jaringan yang tepat sebagai sumber eksplan, keberhasilan embriogenesis somatik juga ditentukan oleh beberapa faktor, di antaranya genotip (Bieysse *et al.*, 1993) dan komposisi zat pengatur tumbuh dalam medium (Gunawan, 1988). Zat pengatur tumbuh berperan penting dalam menentukan arah pertumbuhan suatu kultur. Menurut Wattimena (1988) zat pengatur tumbuh 2,4-D merupakan auksin yang paling umum digunakan untuk menginduksi embriogenesis somatik. Selain auksin, zat pengatur tumbuh sitokinin juga berpengaruh terhadap diferensiasi sel dalam proses embriogenesis somatik. Beberapa jenis sitokinin yang biasa digunakan dalam menginduksi embriogenesis somatik pada

## *Embriogenesis somatik langsung dan regenerasi planlet kopi arabika....*

tanaman kopi adalah BAP, kinetin, zeatin dan 2-ip (Sondahl *et al.*, 1994). Setiap genotip atau jaringan mempunyai respons yang berbeda dalam penyerapan zat pengatur tumbuh dalam medium dan memiliki kandungan zat pengatur tumbuh endogen yang berbeda. Oleh karena itu dalam embriogenesis somatik kadang-kadang hanya dibutuhkan auksin, sitokinin secara sendiri-sendiri atau campuran auksin dan sitokinin.

Beberapa sel ES dapat beregenerasi membentuk embrio somatik kembali yang disebut sebagai ES sekunder. Priyono & Danimihardja (1991) melaporkan bahwa kombinasi yang tepat antara IAA dan BAP mampu menginduksi ES sekunder dari eksplan ES primer pada tanaman kopi arabika. Hal ini memberi harapan untuk penyediaan planlet dalam jumlah besar. Pada akhirnya metode untuk meregenerasikan ES menjadi planlet utuh secara efisien merupakan faktor kritis dalam usaha meregenerasikan planlet kopi melalui ES. Penelitian ini bertujuan untuk (i) menetapkan sumber eksplan yang terbaik dalam pembentukan ES primer, mengetahui pengaruh 2,4-D yang berkombinasi dengan berbagai tingkat konsentrasi 2-ip terhadap pembentukan dan perkembangan ES primer, (ii) kombinasi IAA dan BAP terhadap pembentukan ES sekunder, (iii) GA<sub>3</sub> terhadap perkecambah dan untuk melihat frekuensi keberhasilan aklimatisasi kopi arabika.

### **Bahan dan Metode**

#### *Sumber eksplan*

Bahan tanaman yang digunakan untuk induksi ES adalah kecambah kopi arabika klon BP 426A yang berasal dari

embrio zigotik. Embrio zigotik dalam keadaan steril diisolasi dari benih kopi BP 426A, yang di peroleh dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao, Jember.

Sterilisasi benih dilakukan dengan cara merendam benih kopi dalam alkohol 95% selama lima menit, dilanjutkan dengan perendaman dalam larutan kaporit 4% selama 30 menit. Setelah dibilas sampai bersih, benih dikupas dan dipisahkan embrionya. Seluruh pekerjaan dilakukan dalam *laminar Air-Flow*. Selanjutnya embrio zigotik dikecambahkan dalam medium MS  $\frac{1}{2}$  konsentrasi garam makro dan mikro (Murashige & Skoog, 1962) yang dilengkapi dengan vitamin B5 (Gamborg *et al.*, 1968), 30 g/L sukrosa dan 2 g/L gelrite, dan di subkultur setiap satu bulan. Eksplan berupa daun, epikotil, hipokotil dan akar yang dipotong dengan ukuran  $\pm$  5 mm, berasal dari kecambah *in vitro* berumur 6 bulan.

#### *Induksi ES primer dari berbagai sumber eksplan*

Medium dasar yang digunakan untuk induksi ES primer adalah  $\frac{1}{2}$  konsentrasi garam makro dan mikro MS yang dilengkapi dengan vitamin B5, 20 g/L sukrosa, 2 g/L gelrite dan 250 mg/L polivinil pirolidon (PVP). Percobaan disusun menurut rancangan acak lengkap faktorial. Faktor pertama adalah jenis eksplan, terdiri atas empat eksplan yaitu daun, epikotil, hipokotil dan akar tanaman yang dikulturkan secara *in vitro*. Faktor kedua adalah zat pengatur tumbuh, terdiri atas sembilan kombinasi, yaitu 1  $\mu$ M 2,4-D dengan 5, 10, 15 dan 20  $\mu$ M 2-ip, serta kombinasi 5  $\mu$ M 2,4-D dengan 5,10, 15 dan 20  $\mu$ M 2-ip. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 10 kali

(10 botol), dimana setiap botol terdiri atas lima eksplan, sehingga untuk masing-masing perlakuan dikulturkan sebanyak 50 eksplan. Kultur diinkubasi dalam ruangan gelap yang bersuhu 28°C. Pengamatan dilakukan setelah kultur berumur 16 minggu. Peubah yang diukur adalah jumlah eksplan yang membentuk ES dan jumlah ES yang terbentuk dari masing-masing eksplan yang dikulturkan.

#### *Induksi ES sekunder dari ES primer*

Untuk menginduksi pembentukan ES sekunder, ES primer yang terbentuk disubkultur ke medium dasar dengan penambahan 0,6 µM IAA yang berkombinasi dengan 0,0; 13,3; 17,8 dan 22,2 µM BAP. Penelitian disusun menurut rancangan acak lengkap, dengan setiap unit percobaan terdiri atas lima eksplan yang dikulturkan dalam satu botol. Setiap perlakuan diulang sebanyak delapan kali sehingga total yang dikultur mencapai 40 eksplan. Kultur diinkubasikan di ruang inkubasi yang bersuhu 28°C dan dalam kondisi gelap. Pengamatan perkembangan kultur dilakukan pada umur 8 minggu setelah kultur, dengan menghitung frekuensi eksplan yang membentuk ES sekunder dan jumlah ES yang dihasilkan dari tiap eksplan.

#### *Perkecambahan ES dan regenerasi planlet*

ES dipindahkan ke medium maturasi yaitu medium dasar MS tanpa zat pengatur tumbuh selama lebih kurang 1 bulan agar ES berkembang sempurna dengan kotiledon dan radikula yang normal. Untuk mengecambahkan ES yang sudah mencapai fase kotiledon, ES dipindahkan ke medium perkecambahan yaitu medium dasar MS

dengan penambahan 0, 5, 10 dan 15 µM GA<sub>3</sub>. Efektivitas perkecambahan ditentukan berdasarkan jumlah ES yang mengalami pemanjangan hipokotil, kotiledon membuka dan berwarna hijau. Perkecambahan ES dilakukan dalam ruang kultur yang diberi penyinaran selama 24 jam dengan intensitas penyinaran 1000-1500 luks. ES yang telah berkecambah selanjutnya dipindah ke medium pendewasaan yaitu medium dasar tanpa zat pengatur tumbuh agar berkembang menjadi planlet.

#### *Aklimatisasi*

Planlet dengan tinggi 3-5 cm dan mempunyai 4-5 pasang daun dikeluarkan dari botol kultur, dicuci dengan air kemudian direndam dalam larutan fungisida Benlate 0,2% selama 1 menit. Setelah itu planlet ditanam dalam pot yang berisi medium steril campuran tanah, pupuk kandang dan pasir dengan perbandingan 1:1:1, selanjutnya pot ditutup dengan plastik bening dan diletakkan di rumah kaca. Pembukaan sungkup plastik dilakukan secara bertahap untuk adaptasi dengan lingkungan luar.

## **Hasil dan Pembahasan**

#### *Induksi ES primer dari berbagai sumber eksplan*

Penambahan 2,4-D dan 2-ip secara berkombinasi ke dalam medium perlakuan mampu menginduksi pembentukan ES pada keempat jenis eksplan yang digunakan. Inisiasi embrioid mulai terlihat 9 minggu setelah kultur, yang terbentuk secara langsung pada eksplan tanpa melalui fase pembentukan kalus. Pembentukan ES

diawali dengan terbentuknya embrioid berbentuk bintik-bintik putih pada eksplan yang selanjutnya berkembang membentuk embrio fase globular.

Hasil analisis keragaman menunjukkan adanya interaksi antara konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D dan 2-ip dengan jenis eksplan terhadap persentase pembentukan ES primer dan rata-rata ES per eksplan (Tabel 1). Secara umum, pada medium dengan penambahan 1  $\mu\text{M}$  2,4-D berkombinasi dengan 5, 10, 15 dan 20  $\mu\text{M}$  2-ip, menunjukkan bahwa persentase pembentukan ES meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi 2-ip pada semua eksplan. Dari empat jenis eksplan yang digunakan, tampak bahwa eksplan daun menghasilkan ES lebih banyak dibandingkan dengan eksplan lainnya dengan persentase tertinggi 77,2 % dan rata-rata ES per eksplan 30 buah pada medium dengan penambahan 1  $\mu\text{M}$  2,4-D dan 15  $\mu\text{M}$  2-ip. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Berthouly & Etienne (1999) yang menunjukkan bahwa meskipun berbagai organ dan jaringan tanaman kopi dapat digunakan sebagai sumber eksplan untuk induksi kalus embriogenik dan induksi ES, namun daun muda lebih efektif dibandingkan dengan jaringan somatik lainnya.

Keempat jenis eksplan yang digunakan memberikan respons yang berbeda terhadap pola pembentukan ES. Pada eksplan epikotil, hipokotil, dan akar, ES terbentuk pada permukaan atas eksplan. Sebaliknya pada eksplan daun, ES tumbuh pada sisi eksplan bekas pemotongan yang bersinggungan langsung dengan medium. Hal ini diduga bahwa pada eksplan daun sitokinin dan auksin tidak diserap melalui epidermis daun, tetapi hanya diserap oleh jaringan yang bersentuhan langsung dengan medium,

dan tidak ditranslokasikan ke seluruh jaringan daun. Hal yang sama juga terjadi pada kultur kopi robusta, dimana ES hanya terbentuk pada sisi daun (Hatanaka *et al.*, 1991). Namun pada percobaan yang dilakukan oleh Priyono (1993), ES dapat terbentuk pada permukaan maupun sisi daun. Gunawan (1992) menyatakan bahwa kemampuan morfogenesis berhubungan dengan tempat sel-sel yang berkompeten. Dengan rangsangan zat pengatur tumbuh yang tepat, sel-sel yang kompeten tersebut kemudian beregenerasi.

Peningkatan konsentrasi 2,4-D dari 1  $\mu\text{M}$  menjadi 5  $\mu\text{M}$  pada medium induksi mengakibatkan penurunan jumlah ES yang terbentuk (Tabel 1). Hal ini terjadi karena terbentuknya kalus non-embriogenik yang berlebihan pada eksplan, sehingga menghambat pembentukan dan regenerasi ES. ES yang terbentuk hanya mencapai fase globular, kemudian mengalami pengkalusan kembali. Dibandingkan dengan penambahan 2,4-D 1  $\mu\text{M}$ , kalus yang terbentuk pada medium dengan penambahan 2,4-D 5  $\mu\text{M}$  jauh lebih banyak, dan dari kalus tersebut kemudian tumbuh akar adventif. Adanya perbedaan respons morfologis ini diduga karena tingginya kandungan auksin endogen pada eksplan, sehingga apabila konsentrasi auksin eksogen ditingkatkan, terjadi perbedaan arah perkembangan eksplan.

Gunawan (1992) mengatakan bahwa interaksi dan perimbangan antara zat pengatur tumbuh yang ditambahkan ke dalam medium dan yang diproduksi oleh sel secara endogen akan menentukan arah perkembangan suatu kultur. Penambahan auksin pada medium akan mengubah nisbah zat pengatur tumbuh endogen yang kemudian menjadi faktor penentu untuk proses pertumbuhan dan morfogenesis dari eksplan.

Tabel 1. Pengaruh kombinasi 2,4-D + 2-ip terhadap persentase pembentukan ES primer kopi arabika dan rata-rata jumlah ES per eksplan pada eksplan daun, epikotil, hipokotil dan akar asal kecambah *in vitro* 16 minggu setelah kultur.

Table 1. Effect of 2,4-D + 2-ip combination on percentage of primer SE formation of arabica coffee and average SE number in leaf explants, epicotyl, hypocotyl and root from *in vitro* germinate after 16 weeks of culture.

Medium Medium MS	Daun Leaf		Epikotil Epicotyl		Hipokotil Hypocotyl		Akar Root	
	Pembentukan ES Formation of SE (%)	ES per eksplan SE per explant	Pembentukan ES Formation of SE (%)	ES per eksplan SE per explant	Pembentukan ES Formation of SE (%)	ES per eksplan SE per explant	Pembentukan ES Formation of SE (%)	ES per eksplan SE per explant
2,4-D 0 $\mu$ M+ 2-ip 0 $\mu$ M	0 d*	0 d	0 b	0 b	0 c	0 b	0 c	0 b
2,4-D 1 $\mu$ M + 2-ip $\mu$ M								
5	26,3 c	4,1cd	0 b	0 b	13,5 bc	1,7 b	19,9 bc	2,2 b
10	46,8 b	9,0 c	0 b	0 b	19,2 bc	2,0 b	29,8 b	3,9 b
15	77,2 a	30,0 a	13,5 a	1,3 a	27,9 b	2,9 b	65,5 a	15,5 a
20	66,6 a	21,1 b	9,0 ab	0,8ab	53,0 a	8,7 b	61,9 a	15,2 a
2,4-D 5 $\mu$ M + 2-ip $\mu$ M								
5	0 d	0 d	0 b	0 b	0 c	0 b	0 c	0 b
10	0 d	0 d	0 b	0 b	17,0 bc	1,5 b	0 c	0 b
15	30,5 bc	3,5 cd	0 b	0 b	15,9 bc	1,6 b	13,5 bc	0,7 b
20	13,5 cd	1,1d	0 b	0 b	0 c	0 b	5,8 c	0,2 b

\* Angka-angka dalam kolom yang sama yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf 5 %.

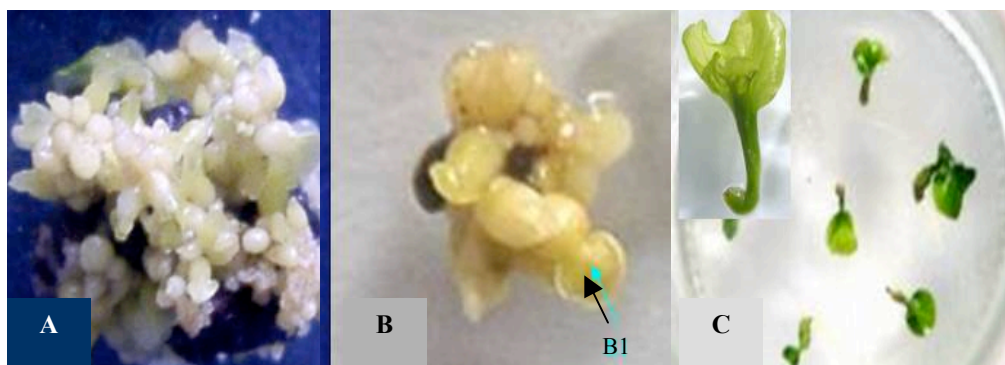
\* The numbers in the same column followed by the same letters are not significantly different at 5 % level according to Duncan test.

*Embriogenesis somatik langsung dan regenerasi planlet kopi arabika....*

Dari hasil penelitian ini terlihat bahwa induksi ES kopi arabika memerlukan sitokinin dengan konsentrasi yang cukup tinggi (15  $\mu\text{M}$ ) dan auksin dengan konsentrasi rendah (1  $\mu\text{M}$ ). Dari hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa sitokinin berperan penting dalam embriogenesis somatik tanaman kopi arabika. Hasil penelitian Yasuda *et al.* (1985) dan Hatanaka *et al.* (1991) menunjukkan bahwa embriogenesis somatik tanaman kopi dapat diinduksi hanya dengan penambahan sitokinin saja. Kelemahan dari embriogenesis secara langsung ini adalah pembentukan embrioid yang tidak serempak sehingga perkembangan embrio tidak seragam (Gambar 1A-C).

Berbeda dengan hasil percobaan ES kopi arabika yang dilakukan Siswanto

(2001) dengan menggunakan eksplan daun kopi arabika dari rumah kaca, dimana senyawa fenolik yang menyebabkan pencokelatan pada eksplan terlihat menghambat embriogenesis somatik, pada percobaan ini ES dapat terbentuk pada eksplan yang sudah mencokelat. Menurut Figueora *et al.*, (2001) pencokelatan pada jaringan yang disebabkan oleh akumulasi senyawa fenolik yang berlebihan, penting untuk proses embriogenesis somatik pada tanaman kopi. Kemungkinan senyawa fenolik berperan sebagai signal untuk induksi diferensiasi. Kemungkinan lain, senyawa ini juga berperan sebagai pengkelat yang menginaktifkan senyawa-senyawa penghambat yang terdapat dalam kultur embriogenik.



Gambar 1. Perkembangan pembentukan dan regenerasi embrio somatik (ES), (A) ES primer, (B) ES sekunder, (B1)-kotiledon muda, (C) ES pada tahapan perkecambahan, insert: kotiledon yang sudah berkembang.

Figure 1. Development formation and regeneration of somatic embryo (SE), (A) primer SE, (B) secondary SE, (B1)-young cotyledon, (C) SE on germination stage, insert: develop cotyledon.

*Induksi ES Sekunder dari ES sekunder*

Penambahan BAP (13,3 - 22,2  $\mu$ M) ke dalam medium induksi ES sekunder mampu menginduksi pembentukan ES sekunder dengan frekuensi antara 48,0 - 52,6 % dari total eksplan yang ditanam (Tabel 2). Proses pembentukan ES sekunder terjadi secara langsung tanpa melalui induksi kalus. Secara morfologi, ES sekunder yang terbentuk tidak berbeda dengan ES primer. Namun tahapan perkembangannya sedikit berbeda, ES sekunder umumnya berkecambah lebih cepat dibandingkan dengan ES primer (Gambar 1B). Banyaknya ES sekunder yang terbentuk sangat dipengaruhi oleh tingkat konsentrasi BAP yang ditambahkan.

Menurut Priyono & Danimihardja (1991) pembentukan ES sekunder bergantung pada penambahan sitokinin ke

dalam medium, dimana BAP memberikan pengaruh yang lebih baik dibandingkan dengan kinetin. Merkle & Sommer (1986) melaporkan bahwa pada tanaman *Liriodendron tulipifera*, induksi ES sekunder dapat diperoleh dengan menggunakan medium induksi yang sama dengan yang digunakan untuk menginduksi ES primer. Apabila dibandingkan dengan rata-rata ES per eksplan pada percobaan induksi ES primer, rata-rata ES sekunder pada percobaan ini masih rendah. Hal ini kemungkinan disebabkan belum optimalnya konsentrasi BAP yang digunakan.

*Perkecambahan ES dan regenerasi planlet*

Setelah dua minggu pada medium perkecambahan, ES mengalami pemanjangan hipokotil, serta kotiledon mulai

Tabel 2. Pengaruh beberapa konsentrasi BAP terhadap pembentukan ES sekunder kopi arabika 8 minggu setelah dikulturkan.

Table 2. Effect of different BAP concentrations on formation of secondary SE of arabica coffee after 8 weeks of culture.

Medium ( <i>Medium</i> ) IAA/BAP	Eksplan yang membentuk ES sekunder <i>Explants formed a secondary SE (%)</i>	Jumlah ES per eksplan <i>Number of SE per explant</i>
0,00/0,00	0,00 b	0,00 b
0,60/13,30	51,70a	4,00 a
0,60/17,80	48,00a	4,25a
0,60/22,20	52,60a	6,25a

Keterangan : Angka-angka dalam kolom yang sama yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf 5 %.

Note : The numbers in the same column followed by the same letters are not significantly different at 5% level according to Duncan test.



membuka dan menghijau (Gambar 1C). Hasil percobaan menunjukkan bahwa penambahan GA<sub>3</sub> ke dalam medium perkecambahan mampu meningkatkan persentase ES yang berkecambah dengan persentase tertinggi diperoleh pada medium dengan penambahan GA<sub>3</sub> 5 µM (Tabel 3). Semakin tinggi konsentrasi GA<sub>3</sub>, persentase embrio yang berkecambah semakin menurun, namun masih lebih tinggi dibandingkan dengan pada medium tanpa penambahan GA<sub>3</sub>. Dengan demikian terlihat bahwa konsentrasi GA<sub>3</sub> yang rendah diperlukan dalam perkecambahan. Menurut Wattimena (1988) GA<sub>3</sub> berfungsi dalam pemanjangan batang dengan memacu sel-sel penyusun batang. GA<sub>3</sub> dalam medium dapat memacu terbentuknya tunas melalui perannya dalam pemecahan pati oleh enzim amilase serta mengaktifkan auksin pada ujung batang.

ES yang telah berkecambah selanjutnya disubkultur pada medium tanpa zat pengatur tumbuh untuk regenerasi planlet. Setelah dua minggu pada medium tersebut, kecambah berkembang menjadi planlet yang ditandai

dengan tumbuhnya akar dan daun primer. Seiring dengan perkembangan planlet juga terbentuk daun-daun baru. Namun, tidak semua ES yang berkecambah dapat tumbuh menjadi planlet normal. Persentase terbentuknya planlet normal mencapai 75%, sedangkan 25% lainnya menunjukkan pertumbuhan tidak normal, yang ditandai dengan tidak berkembangnya kotiledon dan terjadinya pengkalusan pada bagian hipokotil.

#### *Aklimatisasi*

Setelah lima bulan di dalam kultur planlet dengan tinggi 3-5 cm dan mempunyai 4-5 pasang daun yang berwarna hijau gelap mengkilap (Gambar 2A) dipindahkan ke tahap aklimatisasi. Pertumbuhan planlet yang mampu bertahan hidup pada tahap aklimatisasi dapat dilihat pada Gambar 2B. Hanya 60% dari planlet yang diaklimatisasi mampu bertahan hidup. Hal ini kemungkinan disebabkan media aklimatisasi, kondisi lingkungan atau faktor fisik yang belum optimum.

Tabel 3. Pengaruh konsentrasi GA<sub>3</sub> terhadap perkecambahan ES kopi arabika.

*Table 3. Effect of GA<sub>3</sub> concentrations on germination of SE arabica coffee.*

Medium (Medium) GA <sub>3</sub> (µM)	Jumlah ES berkecambah Number of ES germinated (%)	
	Minggu ke-3 Week-3 <sup>th</sup>	Minggu ke-6 Week-6 <sup>th</sup>
0	12,6*	53,7
5	40,9	90,1
10	34,6	77,4
15	30,2	68,5

\* Rata-rata persentase perkecambahan ES tidak berbeda nyata.

\* Average of germination percentage of SE are not significantly.



Gambar 2. (A) Planlet kopi arabika, dan (B) tahapan aklimatisasi, insert: tanaman kopi dirumah kaca.

Figure 2. (A) Plantlets of arabica coffee, and (B). acclimatization stage, insert: coffee in green house.

Pemindahan planlet dari kondisi *in vitro* ke kondisi *in vivo* di rumah kaca merupakan salah satu tahap kritis bagi keberhasilan perbanyakan kultur jaringan. Permasalahan utama pada tahap tersebut berhubungan dengan belum sempurnanya penyerapan air oleh planlet dan adanya kontaminasi (Leconte & Carron, 1988). Planlet hasil perbanyakan *in vitro* juga peka terhadap perubahan lingkungan yang drastis karena stomatanya belum berfungsi dengan baik, lapisan lilin daun sangat tipis dan rongga mesofilnya banyak (Brainerd & Fuchigami, 1981). Oleh karena itu, pada awal aklimatisasi, kelembaban udara yang tinggi perlu dipertahankan.

### Kesimpulan

Induksi ES paling efektif terjadi pada eksplan daun dibandingkan dengan epikotil, hipokotil dan akar kecambah *in vitro*. Persentase dan rata-rata jumlah ES primer

per eksplan tertinggi diperoleh pada medium dengan penambahan 2,4-D  $1 \mu\text{M}$  dan 2-ip  $15 \mu\text{M}$ . Embrioid terbentuk secara langsung tanpa melalui fase kalus, namun pembentukannya tidak serempak sehingga tingkat perkembangan ES cukup beragam.

Penambahan BAP yang berkombinasi dengan IAA ke dalam medium dapat meningkatkan pembentukan ES sekunder dengan persentase tertinggi diperoleh pada media dengan penambahan IAA  $0,6 \mu\text{M}$  dan BAP  $22,2 \mu\text{M}$  yaitu 52,6% dengan rata-rata jumlah ES sekunder per eksplan 6,25.

Penambahan  $\text{GA}_3$   $5 \mu\text{M}$  mampu meningkatkan persentase perkecambahan ES yaitu 40,9% pada minggu ke tiga dan 90,1% pada minggu ke enam setelah dipindah ke medium perkecambahan. Dari total embrio yang berkecambah, diperoleh 75% planlet normal. Sekitar 60% planlet tersebut mampu bertahan hidup pada medium tanah : pupuk kandang : pasir (1:1:1) dalam aklimatisasi di rumah kaca.

**Daftar Pustaka**

- Berthouly, M. & H. Etienne (1999). Somatic embryogenesis of coffee. In S.M. Jain *et al.* (eds.). *Somatic embryogenesis in woody plants*, vol 5. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. p. 259-288.
- Bieysse, D., A. Gofflot & N. Michaux-Ferriere (1993). Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Can. J. Bot.*, **71**, 1496 -1502.
- Brainerd, K.E. & L.H. Fuchigami (1981). Acclimatization of aseptically cultured apple to low relative humidity. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **106**, 515-518.
- Carneiro, M. F. (1999). Advances in coffee biotechnology. *AgBiotechnet*, **1**, 1-7.
- Carneiro, M. F. & T.M.O. Ribeiro (1990). Culture of meristems and plant regeneration in cvs Caturra and in two selection S4 Agaro and DK 1/6. *Physiol. Plant.*, **79**, 27-30.
- Figueroa, Q., F. Larque-saavedra, A. Mendez-zeel, M. Layola-vargas & M. Victor (2001). Growth and somatic embryogenesis in *Coffea arabica* tissue culture can be induced by salicylates. <http://abstracts.aspb.org/aspp2001/public/p26/0122.html>.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller & K. Ojima (1968). Nutrient requirement of suspension culture of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.*, **50**, 151-158.
- Gunawan, L. W. (1992). *Teknik kultur jaringan*. Bogor, Pusat Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor. 245p.
- Hatanaka, T., O. Arakawa, T. Yasuda, N. Uchida & T. Yamaguchi (1991). Effect of plant growth regulator on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. *Plant Cell Rep.*, **10**, 179-182.
- Kushalappa, A.C. (1989). Introduction. In A.C. Kushalappa & A.B. Eskes (eds). *Coffee rust: epidemiology, resistance and management*. Boca Raton, CRC .p. 13-80.
- Leconte, A. & M.P. Carron (1988). Acclimatization of microcuttings from rubber (*Hevea brasiliensis*): problem and perspective. In J.L. Jacob & J.C. Prevot (eds.) *Compte-Rendu du Colloque Exploitation-Physiologie et Amelioration de Hevea. Colloque Hevea IRRDB, IRCA/CIRAD*, Paris, 2 au Novembre 1988, p 499-503.
- Merkle & H.E. Sommer (1986). Somatic embryogenesis in tissue culture of *Liriodendron tulipifera*. *Can. J. For Res.*, **16**, 1317 – 1321.
- Murashige, T. & F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497.
- Neuenschwander, B. & T.W. Baumann (1992). A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea Arabica*. *Plant Cell Rep.*, **10**, 608-612.
- Priyono (1991). Organogenesis dan embriogenesis somatik pada *in vitro*

- jaringan hipokotil kopi arabika. *Pelita Perkebunan*, **6** (4), 97-102.
- Priyono. (1993). Embriogenesis somatik langsung pada kultur *in vitro* eksplan daun kopi arabika (*Coffea arabica*). *J. Pert. Indonesia*, **3** (1), 16-20.
- Priyono & S. Danimihardja (1991). Reproduksi embrio somatik kopi arabika dengan menggunakan BAP dan Kinetin serta regenerasi planlet dengan menggunakan Ca-P dan biotin. *Dalam Prosiding Seminar Bioteknologi Perkebunan dan Lokakarya Biopolimer Untuk Industri*. Bogor, 10-11 Desember 1991. Bogor, Pusat Antar Universitas IPB.
- Priyono & I. Hartana (1991). Perbanyak mikro kopi arabika melalui teknik induksi tunas adventif secara langsung dan penggandaan tunas aksilar. *Dalam Prosiding Seminar Bioteknologi Perkebunan dan Lokakarya Biopolimer Untuk Industri*. Bogor, 10-11 Desember 1991. Bogor, Pusat Antar Universitas IPB.
- Siswanto (2001). *Perakitan tanaman transgenik kopi arabika tahan terhadap penyakit karat daun*. Riset Unggulan Terpadu VII. Bogor, Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia.
- Sondahl, M. R., W. R. Romig & A. Bragin (1994). *Induction and selection of somaclonal variation in coffee*. United States Patent. USA.
- Sreenath, H.L., H.M. Shanta, K.H. Babu & M.M. Naidu (1995). Somatic embryogenesis from integument (perisperm) cultures of coffee. *Plant Cell Rep.*, **14**, 670-673.
- Wattimena, G. A. (1988). *Zat pengatur tumbuh tanaman*. Bogor, Pusat Antar Universitas IPB.
- Yasuda, T., Y. Fujii & T. Yamaguchi (1985). Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant Cell Physiol.*, **26**, 595-597.